

COMUNICACION CORTA

Método para la determinación por cromatografía de gases del contenido de D002, una nueva sustancia biológicamente activa purificada de la cera de abejas

Víctor L. González, Roxana C. Sierra, Juan Magraner y Eduardo A. Rodríguez-Leyes.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 4 de agosto de 2004. Aceptado: 30 de noviembre de 2004.

Palabras clave: D002, sustancia biológicamente activa, determinación, cromatografía de gases.
Key words: D002, biologically active substance, determination, gas chromatography.

A partir de la cera de abejas (*Apis Mellifera*) saponificada ha sido extraída y purificada una nueva sustancia biológicamente activa que se ha denominado D002, la cual está compuesta por una mezcla de alcoholes alifáticos lineales homólogos con número par de átomos de carbono entre el C_{24} y el C_{34} .¹ Esta nueva droga demostró poseer cualidades como protectora de la mucosa gástrica, anti-inflamatoria¹ y antioxidante,^{2,3} por lo que con vistas a su aplicación como suplemento dietético en humanos, se desarrolló una metodología analítica para la determinación de los seis alcoholes que la componen.

La metodología desarrollada, al ser sometida al proceso de validación descrito en el presente trabajo, demostró que es aplicable en el proceso de control de calidad. Está basada en el empleo de la Cromatografía de Gases (CG) con el equipamiento, las condiciones operacionales y el método de cálculo anteriormente descrito.⁴ Los patrones de referencia utilizados (> 98 % CG) y el N-metil-N-trimetilsililtri fluoroacetamida (MSTFA) fueron de la FLUKA, mientras los demás reactivos y disolventes (puros para análisis) fueron de la MERCK. La muestra de referencia se preparó a partir de 250 mL de una disolución de C_{24} , C_{26} , C_{28} y C_{30} (todos a 0,12 mg/mL) en cloroformo, la cual se llevó a sequedad a 60 °C con corriente de aire y luego, se le adicionaron 50 mL de una disolución de C_{20} (0,4 mg/mL) en clo-

roformo como patrón interno. Para preparar la muestra de ensayo se pesaron con precisión alrededor de 23 mg de D002, se añadieron 5 mL de la disolución de C_{20} y 2 mL de cloroformo, se calentó a 60 °C con agitación ocasional hasta disolución y se tomaron 150 mL. Tanto la muestra de referencia como la de ensayo se derivatizaron con 30 mL de MSTFA a 60 °C durante 15 min.

La aplicabilidad del sistema se determinó mediante la resolución entre los pares de alcoholes C_{24} - C_{26} , C_{26} - C_{28} , C_{28} - C_{30} y C_{30} - C_{32} ($n = 3$) y por la repetibilidad de la inyección, al analizar una misma muestra de ensayo ($n = 6$); los resultados (Resolución > 2 y coeficiente de variación = 0,43 %, respectivamente) garantizaron una buena separación entre las señales cromatográficas y una buena precisión del sistema inyector-detector.⁵ La especificidad del método se determinó por comparación de los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras de ensayo (6 lotes) con el obtenido para el patrón interno, de donde se determinó que no existían interferencias.

La linealidad del sistema se determinó mediante el análisis de 50, 100, 200, 300 y 500 mL de la disolución de referencia ($n = 5$), los que se llevaron a sequedad antes de aplicar la metodología analítica. La ecuación de regresión, calculada al graficar las relaciones de áreas obtenidas ($y = A/A_{pi}$) en función de las relaciones de masas añadidas ($y = m_i/m_{pi}$), fue: $y = (1,09 \pm 0,10) x$

$- (0,03 \pm 0,09)$; con un coeficiente de correlación (r) de 0,999; un coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_f) de 2,08 % y límites de confianza de la pendiente y del intercepto que incluyeron al uno y al cero respectivamente. Dichos parámetros cumplieron con los criterios de aceptación,⁵ por lo que se pudo considerar que el sistema era lineal.

La linealidad y la exactitud del método se estudiaron entre aproximadamente el 50 y el 150 % de la masa nominal de D002 (12, 17, 23, 28 y 35 mg) ($n = 3$). La ecuación de regresión, determinada a partir de las masas cuantificadas en función de las añadidas, fue:

$$y = (0,89 \pm 0,03) x - (0,03 \pm 0,12)$$

con $r = 0,999$; CV_f inferior al límite establecido de 5 % (3,37 %) y límites de confianza del intercepto que incluyeron al cero. El recobrado medio de la cuantificación fue de 100,17 % con un coeficiente de variación (CV) = 1,27 %, lo que indica que el método además de lineal es exacto en todo el intervalo estudiado.⁵

El estudio de precisión abarcó la determinación de la repetibilidad (un técnico analizó una muestra en un solo día, $n = 10$) y de la precisión intermedia (dos técnicos analizaron tres lotes en días diferentes, $n = 6$ para cada lote). El CV de la repetibilidad y el CV promedio de la precisión intermedia (1,09 y 1,37 %, respectivamente) fueron inferiores al

2 %, límite establecido para métodos cromatográficos,⁵ por lo que se puede considerar que el método es preciso. Se determinó además, mediante las pruebas *F* de Fisher y *t* de Student, que no hubo diferencias en el contenido de alcoholes totales determinados por ambos técnicos, lo que confirma la precisión del método.

Finalmente, se determinó la robustez del método mediante el diseño experimental de Youden y Steiner⁵ para los parámetros operacionales siguientes: temperaturas del inyector, detector e inicial del horno (todas ± 10 °C), flujo de gas portador (± 5 mL/min), gradiente de temperatura (± 2 °C/min), fase estacionaria (OV-17 al 1,5 %) y volumen de inyección (± 1 mL). El total de alcoholes determinado, la repetibilidad y la resolución entre los alcoholes C_{28} y C_{30} fueron los resultados a través de los que se determinó la influencia

de cada parámetro. La única afectación de los resultados observada fue que al cambiar la fase OV-101 al 3 % por la empleada en este trabajo disminuyó la resolución, aunque esta fue siempre superior al límite requerido para la realización de los análisis.

La presente validación permitió contar con un método para el control de calidad del D002 Materia Prima en los lotes producidos, los cuales al ser analizados mostraron la composición de alcoholes siguiente: ($9,4 \pm 2,0$) % de C_{24} ; ($10,5 \pm 2,0$) % de C_{26} ; ($14,6 \pm 2,5$) % de C_{28} ; ($29,7 \pm 3,0$) % de C_{30} ; ($22,8 \pm 3,0$) % de C_{32} y ($3,5 \pm 1,5$) % de C_{34} .

BIBLIOGRAFIA

1. Magraner J., Laguna A., Más R., Carvajal D., Arruzazabala M.L., Días M., Molina V. y Valdés S. Una mezcla natural compuesta por alcoholes alifáticos primarios obtenidos de la cera de

abejas para el tratamiento de las úlceras gástricas y duodenales que presenta también actividad anti-inflamatoria. Patente C.I. AGI/C31/045, 35/64, 1995.

2. Menéndez R., Amor A.M., González R.M., Jiménez S. and Más R. Inhibition of rat microsomal lipid peroxidation by the oral administration of D-002. **Brazil J. Med. Biol. Res.**, **33**, 85, 2000.
3. Menéndez R., Más R., Illnait J., Pérez J., Amor A.M., Fernández J.C. and González R.M. Effects of D-002 on lipid peroxidation in older subjects. **J. Med. Food.**, **4**, 71, 2001.
4. Sierra R., González V., Magraner J., y Cuéllar A. Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de D002 en tabletas con dosis de 50 y 100 mg por Cromatografía Gaseosa. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **35**, 127-130, 2004.
5. Castro M., Gascon S., Pujol M., Sans J.M. y Vicente L. Validación de métodos analíticos, A.E.F.I., Sec. Catalana, España, 1989.



RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

APLICACION DE MARCADORES MOLECULARES AL ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD DEL GANADO BOVINO CUBANO

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

Los estudios de biodiversidad son prioritarios en muchos campos científicos. La caracterización genética del ganado autóctono supone conocer la situación de las poblaciones para su conservación. Hasta el momento, el conocimiento de las características genéticas del ganado bovino cubano se ha basado en el análisis de polimorfismos bioquímicos de grupos sanguíneos y proteínas lácteas. Su clasificación se ha realizado según diferencias fenotípicas de cada raza y de la evaluación de parámetros productivos.

El trabajo realizado permitió determinar por primera vez, mediante marcadores moleculares, la estructura genética para los genes de las seis proteínas lácteas y de 30 loci microsátélites recomendados por la FAO, de tres razas bovinas cubanas: Criollo, Siboney y Cebú Cubano. Para la caracterización de dichas razas se calcularon las frecuencias alélicas, las heterocigosidades por locus y para cada población y se determinaron los parámetros de equilibrio y las relaciones citogenéticas entre ellas y con ocho razas españolas de referencia.

Se identificaron alelos específicos que pueden ser utilizados como marcadores raciales. Fue comprobado que existe una elevada variabilidad en las tres poblaciones cubanas analizadas, lo cual es importante para el diseño y control de programas de mejoramiento.

El Cebú Cubano está más alejado filogenéticamente del Siboney y del Criollo de Cuba y este más cercano de razas españolas que se reportan como las que probablemente fueron introducidas en América en la época de la colonización.

Con los resultados obtenidos se dispone de una metodología de análisis de marcadores moleculares para la caracterización del ganado bovino cubano, tanto para estudios de biodiversidad, como para otras aplicaciones de interés económico. El trabajo fue seleccionado como el más destacado en el curso académico 2004-2005 en la Sección de Ciencias Agropecuarias.